U.D.C. [543. 544. 42. 084. 82-52 : 543. 087. 9 : 681. 322/. 323-181. 48] : 547. 466. 06

アミノ酸の高速液体クロマトグラフィ
High Speed Liquid Chromatography for Amino Acids

鴈野重威* Ganno Shigetake
藤井芳雄** Fujii Yoshio
藤田一紀*** Fujita Kazunori
武内瀞士**** Takeuchi Seiji

1958年Mooreらによって，イオン交換クロマトグラフィによるアミノ酸の自動分析法が発表されて以来，分析法・装置両面の進歩によって，応用範囲も著しく拡大された。

日立製作所では，アミノ酸分析の高速化・高感度化などについて検討を重ねた結果，蛋白質を構成している約20種のアミノ酸を1時間以内に，生体液中に含まれる複雑なアミノ酸及び類縁物質を3時間余りで高速分離する手法を開発し，同時にオートサンプラや高圧微量定流量ポンプ，凹面回折格子を用いた光度計，また分析部の制御とデータ処理にマイクロコンピュータを用いて，試料の導入から分析結果のプリントアウトまで，自動的に連続分析のできる装置を開発した。

本稿では，高速分離の検討結果と装置の概要及びその応用例について報告する。

1 緒　言

アミノ酸分析は，蛋白質化学での一次構造の研究だけでなく，アミノ酸代謝の研究，患者の血液や尿中の遊離アミノ酸の質的・量的な変動を知ることによって病状を追跡したり，先天性代謝異常などの疾患のスクリーニングなど医学的分野をはじめ，食品や飼料・医薬品などのアミノ酸組成の分析など，およそ蛋白質やアミノ酸が関与する分野では欠くことのできない分析法である。

1958年，Spackman，Stein，Mooreら[1)]のアミノ酸の自動分析法は，アミノ酸分析の自動化だけでなく液体クロマトグラフィが機器分析としてスタートした非常に重要な意義をもっている。その後，分析法，分析装置両者の進歩によってその応用範囲も著しく拡大された。当初分析時間も，蛋白質を構成している約20種のアミノ酸の分析(以下，標準分析法という)に22時間を要していたのが，現在では1時間以内にまで短縮されるに至った。

一方，分析感度の向上，分析操作の多様化・省力化に対応できる装置の要求も高まり，操作性・保守性・安全性についてもいっそうの進歩が望まれている。日立製作所では，アミノ酸分析の高速化・高感度化・自動化について検討を重ねた結果，標準分析法を約1時間で，生体液中に含まれる複雑なアミノ酸及び類縁物質の分析(以下，生体液分析法という)を3時間余りで分析する手法と，試料の導入やデータ処理も含め，マイクロコンピュータ内蔵の分析装置を開発したので，ここに報告する。

2 アミノ酸分析の高速化

一般に液体クロマトグラフィを高速化するためには，

(1) 溶離液の線速度(流速)を速くする。そのためには，例えばカラムの内径を細くする。

(2) カラムの長さを短くする。

(3) 溶離条件(選択性)を検討し，改良する。

などが挙げられる。しかし，液体クロマトグラフィでは，隣接した二つのピークを完全に分離することが基本である。これは，分配係数にかかわる二つのピークの相対的溶出位置と，ピークをいかにシャープにするかが重要である。そのためには，カラムの選択性を改善し，カラム効率を高くすることが肝要で，アミノ酸分析では(1)溶離液のpH，(2)溶離液のイオンの種類と濃度，(3)溶離液中の有機溶媒(エタノール)の濃度，(4)カラム温度などについて最適条件を決定することである。カラム効率の改善には，カラム及び流路系全体での拡散・混合を防止して，ピークをシャープに溶出することで，次に述べるような点を考慮すべきである。すなわち，(1)カラムサイズ(カラムの内径と長さ)，(2)充填剤のカラムへの均一な充填，(3)充填剤の微粒子化と粒径分布が狭いこと，(4)拡散定数の増大(適切なカラム温度の設定)などである。

2.1 分離率と理論段数

アミノ酸の高速分離には，近接する二つのピーク，すなわちトレオニンとセリン(Thr/Ser)，グリシンとアラニン(Gly/Ala)の分離を良くすることが重要な要素である。

一般に液体クロマトグラフィでは分離能Rsは，

$$Rs=\frac{1}{4}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_2}{1+k'_2}\right)(N_2)^{\frac{1}{2}}$$ で表わされる。

ここで　α：相対保持力，すなわち分離係数

k'：キャパシティ比，固定相中の溶質の量／移動相中の溶質の量

N：理論段数で，下付きの2は2番目の成分を意味する。

上式は，有効理論段数を導入することによって，

$$Rs=\frac{1}{4}\left(\frac{\alpha-1}{\alpha}\right)(N_{eff})^{\frac{1}{2}}$$ として表わされる。

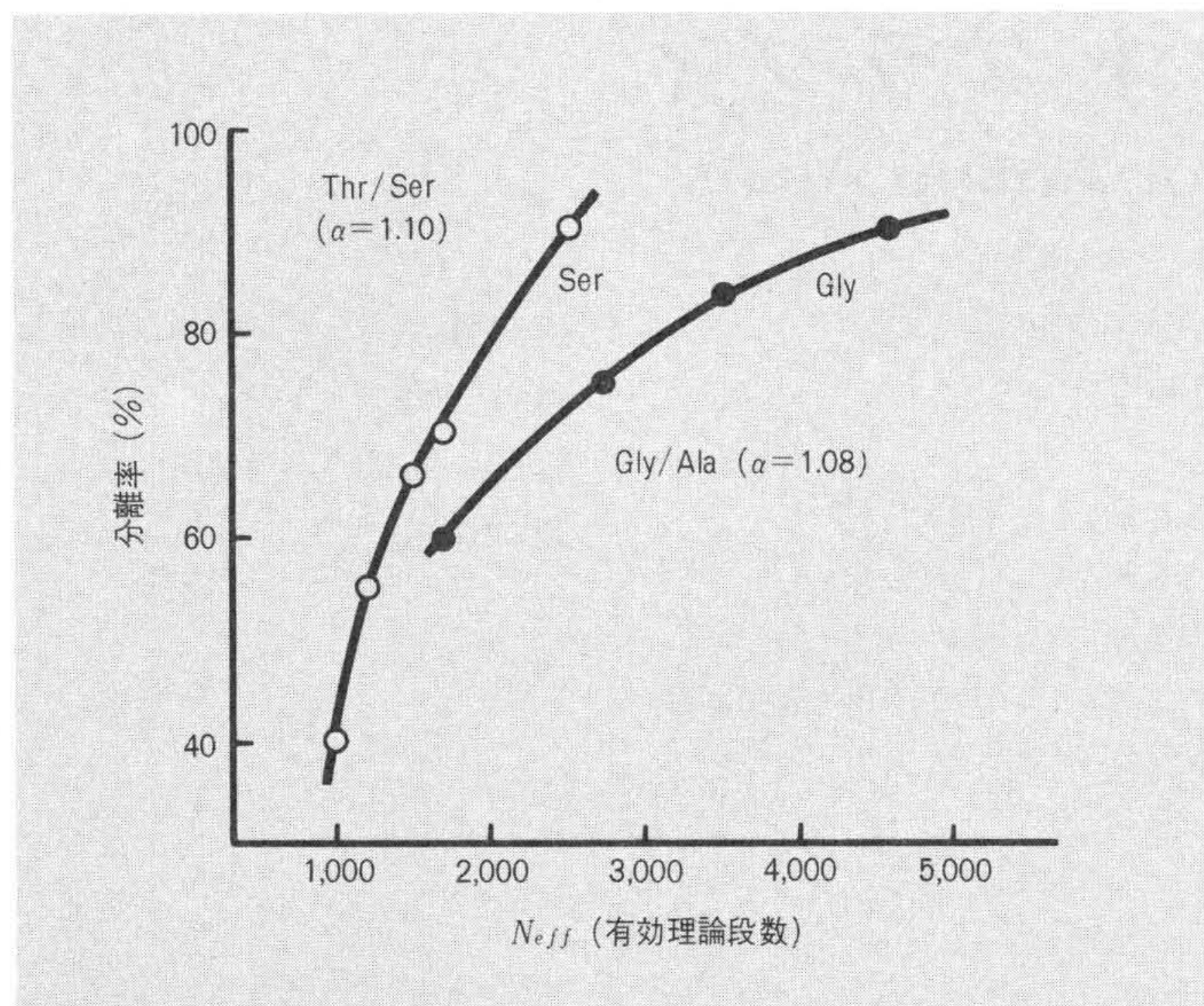
図1に，Thr/Ser，Gly/Alaの分離率と有効理論段数との関係を示した。すなわち，分離係数αがそれぞれ一定の場合のSerとGlyの有効理論段数を示したもので，分離率は，**図2**に示す式によって求めた。これから，70%の分離を得るためには，2,000～2,500段以上あればよいことが分かる。このほか，カラムの内径と長さ，溶離液中のエタノール濃度，カラム温度なども検討した[2)~4)]。

2.2 イオン交換樹脂のカラムへの充填

図3に，カラム充填圧に対して，カラム効率の目安として分離率との関係を示したが，比較的高い圧力で充填したほう

* 日立製作所那珂工場 理学博士　** 日立製作所那珂工場　*** 日立製作所日立研究所 工学博士　**** 日立製作所日立研究所

図1　分離率と有効理論段数[4]の関係　分離係数αが一定になる条件を選んだ。

図3　カラム充塡圧と分析中のカラム圧及び分離率との関係　例えば，100kg/cm²で充塡すると分析中のカラム圧は約50kg/cm²となり，分離率はそれぞれ約80%及び70%となる。

が性能の良いカラムを調製できることが分かった。すなわち，200～230kg/cm²になるように流量を設定して，室温で2時間緩衝液を流してから分析に使用するようにした。

3　アミノ酸分析法

3.1　シングルカラム分析法

従来アミノ酸分析は，酸・中性アミノ酸と塩基性アミノ酸を，別々の2本のカラムを用いて分析していた。この方法は，一方のカラムで分析している間に他のカラムを再生することができるので，分析時間を短縮することができたが，反面，試料をそれぞれのカラムに添加する必要があったり，カラムの切換えが必要で不都合な点も多かった。これらの欠点を改良し，先に述べたように高速化の条件を満足する分離技術を開発し，いわゆるシングルカラム分析法を採用することにした。

3.2　アミノ酸の分析条件[5]

上に述べたような，アミノ酸分析の高速化についての検討を重ねた結果，**表1**に示すような分析条件を決定し，標準分析法で約1時間，生体液分析法では約4時間でそれぞれ高速分離する方法を確立し，これらの分析条件を満足するような835形日立高速アミノ酸分析計(以下，835形と略す)を開発した。

4　高速アミノ酸分析計の概要[5]（図4）

4.1　分離カラム

内径2.6mmのステンレス製の管に，室温の影響を受けない構造のジャケット付で恒温槽の水を循環させて，一定温度に保つようにした。カラムの長さは標準分析法150mm，生体液分析法250mmで，従来に比べて内容積を$\frac{1}{40}$～$\frac{1}{50}$に小さくすることができた。イオン交換樹脂は，スルフォン酸形陽イオン交換樹脂で，粒度のそろった細かい球状のものを均一に充塡するため，送液ポンプを用いて高圧で充塡した。

4.2　溶離液

アミノ酸の分離溶出に用いる緩衝液は，標準分析法ではクエン酸ソーダを4種類，生体液分析法ではクエン酸リチウムを5種類用いる。再生液はそれぞれ，0.2Nのか性ソーダ及び

図2　分離率の計算法　近接した二つのピーク(Thr/Ser，Gly/Ala)の分離率はこの図のように求めた。

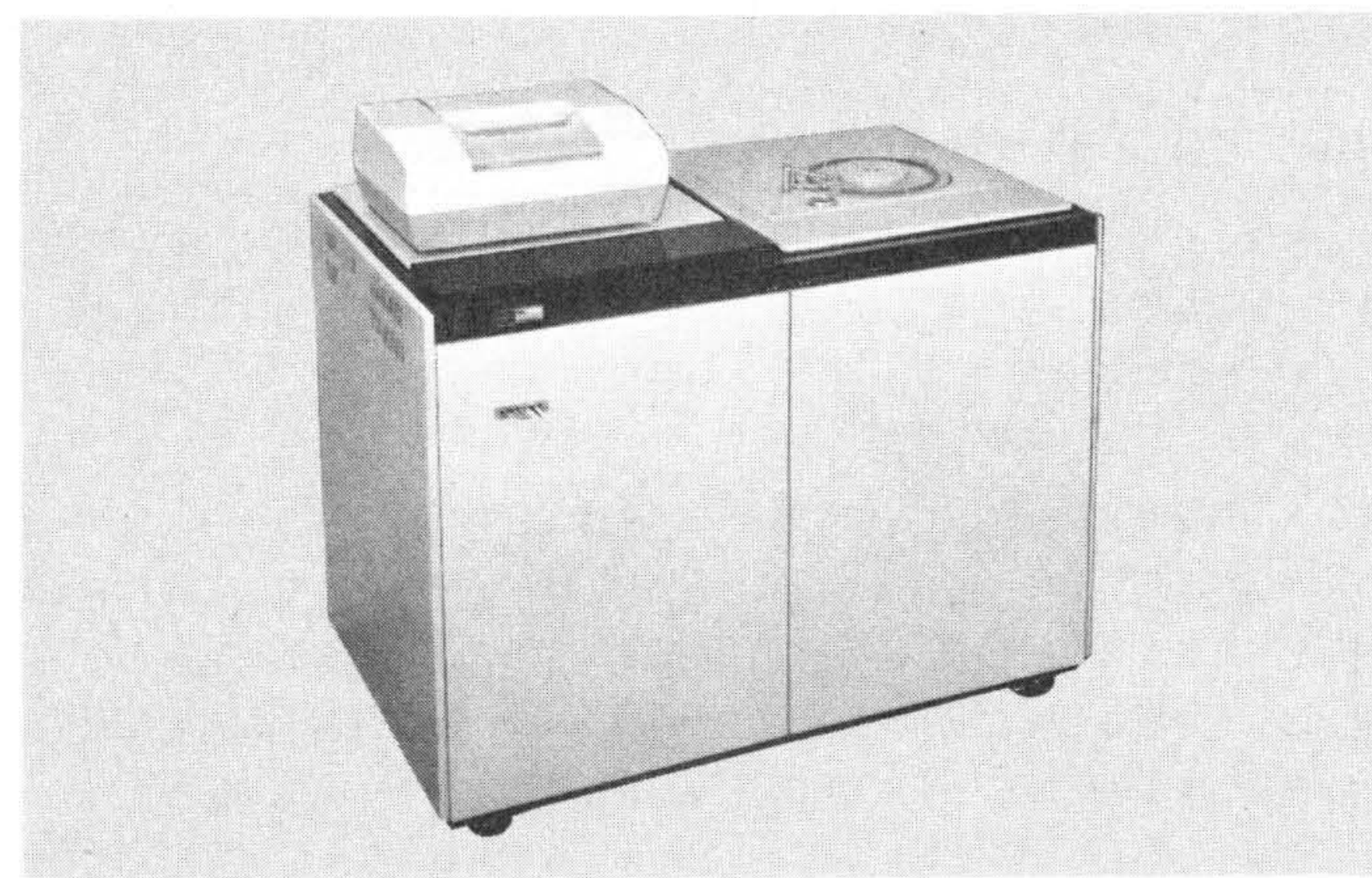



図4　835-50形日立高速液体クロマトグラフ　本体の外観を示すもので，ニンヒドリン試薬用として右側に冷蔵庫が付属されている。

水酸化リチウム溶液を用い，それぞれ1 lの耐圧びんに窒素ガスで加圧され，脱気装置を経て，電磁弁で選ばれた1種類の溶離液が送液ポンプでカラムに送られる。

4.3　アミノ酸の検出

カラムから分離溶出されたアミノ酸は，別の送液ポンプで送られたニンヒドリン試薬と混合されて反応槽で加熱発色され，生成した色素(DYDA)の吸光度を570nm及び440nmで測定する。

図5に，この装置の流路系統図を示す。

4.4　微量定流量送液ポンプ

溶離液とニンヒドリン試薬は，それぞれ各1台のポンプを用いる。このポンプは往復運動方式のプランジャ形のもので，0.2～1.0ml/minの流量範囲で最高吐出し圧200kg/cm^{2}の高圧に耐え，高圧でのカラム充填や，高速分離に重要な役割を果たしている。

4.5　試料導入装置(オートサンプラ)

ターンテーブル上に設置された72個の試料管(0.5ml)に試料をセットしておくと，サンプリングバルブの計量コイルで正確に50μlに計量され，分析が開始される。試料はサンプラのポンプで250μl吸引され，そのうち50μlがカラムに添加されることになる。生体試料など試料量が少量しか得られない場合には，別にマニュアルサンプラを用いて，手動でマイクロシリンジで計量しカラムにサンプリングすることも可能である。

4.6　マイクロコンピュータによる装置の制御

オートサンプラによる試料の自動添加，溶離液やカラム温度の切換え，カラムの再生や平衡化など分析に必要なプログラムは，マイクロコンピュータで集中制御されており，本体上部の操作部のキーボードから入力することができる。また，一定条件によるルーチン分析の場合には，磁気カード方式のプログラムカードによりワンタッチで入力することもできる。操作部のディスプレイには6桁の数字が表示され，オートサンプラによるサンプリング数や分析時間，プログラムのチェックや修正などの表示のほか，ポンプやオートサンプラの異常，反応槽や恒温槽の温度暴走などがエラー表示として番号で表示され，装置が自動停止するような安全対策も施されている。

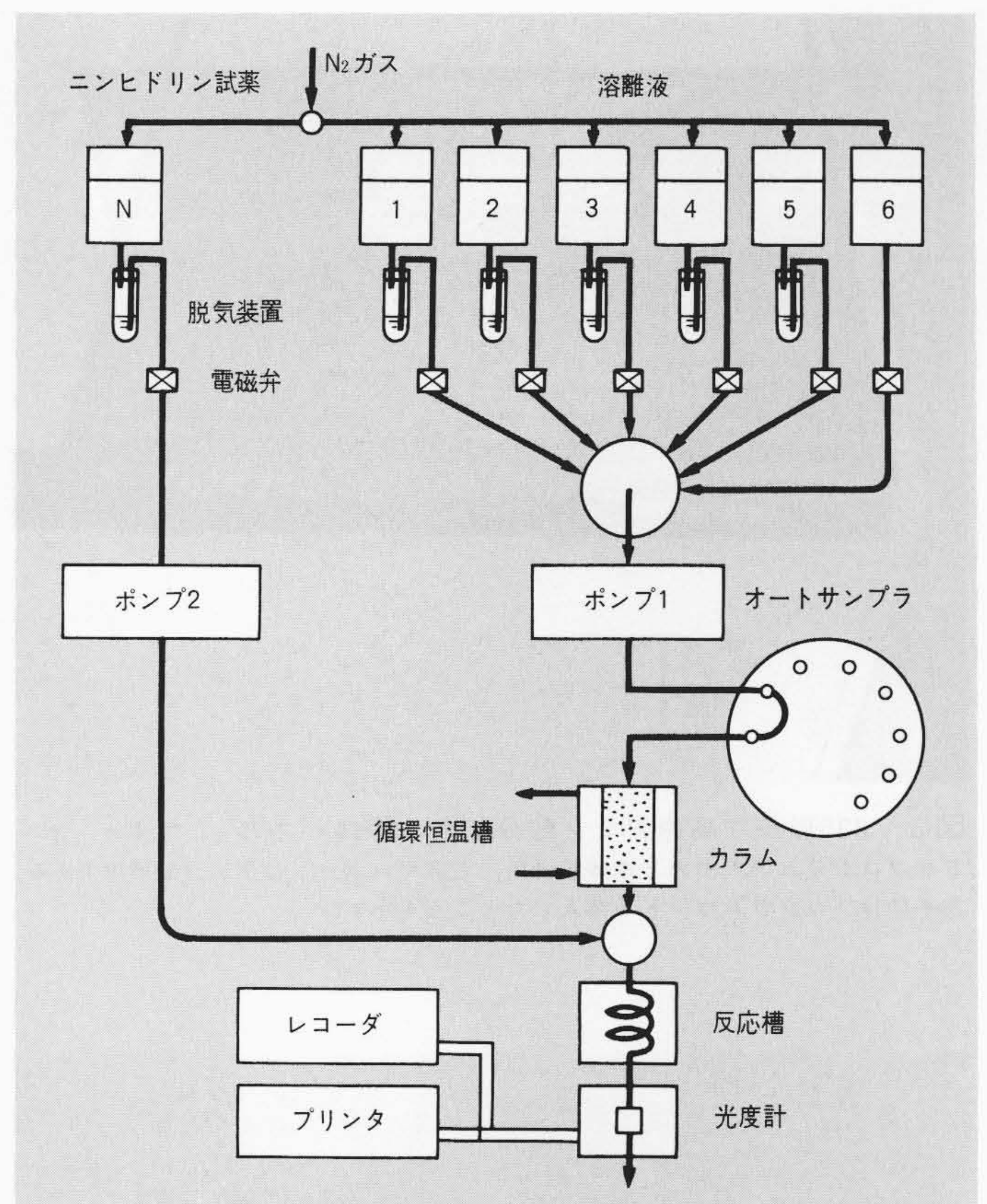



図5　835形日立高速アミノ酸分析計の流路系統図　高速アミノ酸分析計の流路を系統図に示す。

表1　アミノ酸の分析条件　アミノ酸分析の高速化について検討した結果を示す。

項目＼分析法	標準分析法	生体液分析法
カラム	内径2.6mm　長さ150mm	内径2.6mm　長さ250mm
イオン交換樹脂	日立カスタムイオン交換樹脂 ＃2619	同　左
カラム温度	53℃	34→43→47→65→68℃
溶離液	①0.2Nクエン酸ソーダpH3.3 ②0.2Nクエン酸ソーダ〃 3.2 ③0.2Nクエン酸ソーダ〃 4.3 ④1.2Nクエン酸ソーダ〃 4.9	①0.16Nクエン酸リチウムpH3.0 ②0.26Nクエン酸リチウム〃 3.7 ③0.8Nクエン酸リチウム 〃 3.3 ④1.0Nクエン酸リチウム 〃 4.1 ⑤1.2Nクエン酸リチウム 〃 7.0
再生液(RG)	⑥0.2Nか性ソーダ	⑥0.2N水酸化リチウム
流量　溶離液	0.225ml/min	0.275ml/min
流量　ニンヒドリン試薬	0.3　ml/min	0.3　ml/min
分析時間	70分(再生を含む)	228分(再生を含む)
分析プログラム	溶離液の切換え 分析時間　溶離液 1分 (サンプリング) ① 3 ② 13 ③ 21 ④ 47 ⑥ 51 ① 70	切換時間 カラム温度 1分 (サンプリング) 34℃ 32 43 60 47 108 65 186 68 210 34 228 溶離液 1分 ① 76 ② 104 ③ 144 ④ 170 ⑤ 194 ⑥ 200 ① 228

図6は，プログラムの入出力を行なうキーボード(左側)及びデータ処理用の操作盤で，左手前はプログラムカードを挿入しているところを示す。

4.7　結果の計算と報告(データ処理)

分析時間が短縮されるに従って得られた膨大な量のクロマトグラムから，それぞれのアミノ酸の量を計算することは容易な仕事ではない。ここでは本体制御とは別のマイクロコンピュータを用いて，ピークの溶出時間，ピークの高さと面積及びアミノ酸の名称やアミノ酸量，すなわちモル数(n mol)と重さ(n gram)が数値で打ち出される。同時に570nm又は440nmのどちらか1波長だけのクロマトグラムをプリンタ上に描くことができる。**図7**に標準分析法による，**図8**に生体液分析法による標準試料混合物のクロマトグラムと計算結果の一例をそれぞれ示す。

5　分析例

5.1　生体液分析法による分析例

アミノ酸分析は多岐にわたっているため，分析目的に最も

図6　835形日立高速アミノ酸分析計の操作パネル　左側キーボードがプログラムの入出力と本体制御用，右側キーボードはデータ処理用である。左手前はプログラムカードを挿入したところを示す。

適した分析法を選ぶことが肝要である。したがって，分析装置は多種な分析法に適用できることが必要である。例えば，緩衝液の切換時間やカラム温度が自由に選べることなどが必要である。ここでは，先の**表1**に示した生体液分析法を用いて分析を試みたクロマトグラムを**図9，10**に示す。

図9は尿の分析例を示すもので，健康な成人男子の凍結保存尿をそのまま50μlについて分析したものである。また**図10**は，ある発育不全症小児の血清を0.02N塩酸で2倍に希釈したもの50μlについて分析を試みたものである。一般に血清中の遊離アミノ酸を分析するには，血液1 mlに2%のスルホサリチル酸溶液1 mlを加え，遠心分離(3,000rpm15分)した上澄み液を最適濃度になるように希釈したものを試料とするのが普通である。いわゆる小児のアミノ酸代謝異常症のスクリーニングに使われる沪紙に浸透させる血液は，沪紙を直径9 mmに切り取った場合，約20μlの血液量に相当する。これを，スルホサリチル酸で除蛋白した血清を300μlになるようにしてオートサンプラでサンプリングすると，カラムに添加される血液量は約3μlに相当する。**図8～10**に示すクロマトグラムは，記録計のフルスケールが0.5吸光度であるが，感度を5倍に上げて0.1吸光度にすることによって，十分検出記録

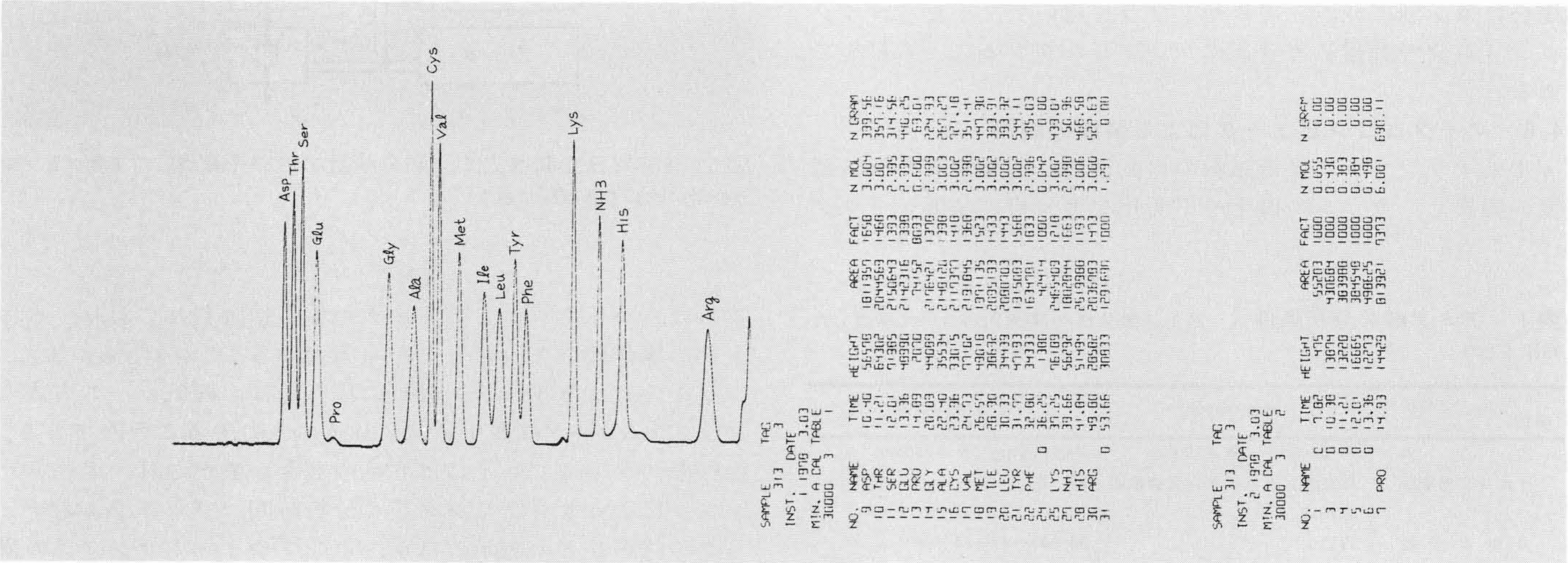



図7　標準分析法によるデータ　データ処理を行なってプリントアウトしたもので，クロマトグラムと計算結果が1枚のチャートにプリントされる(分析条件は表1参照)。

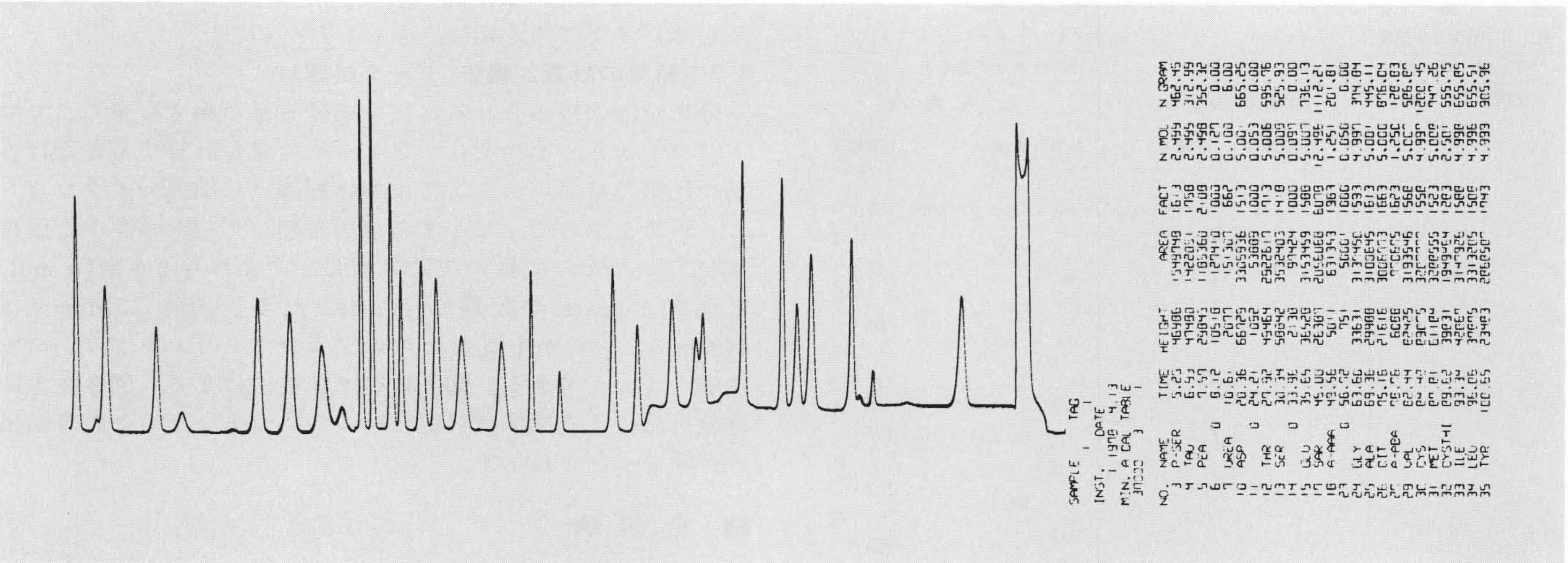



図8　生体液分析法によるデータ処理　生体液分析法による標準試料を分析し，そのデータ処理を行なった結果を示す(分析条件は表1参照)。

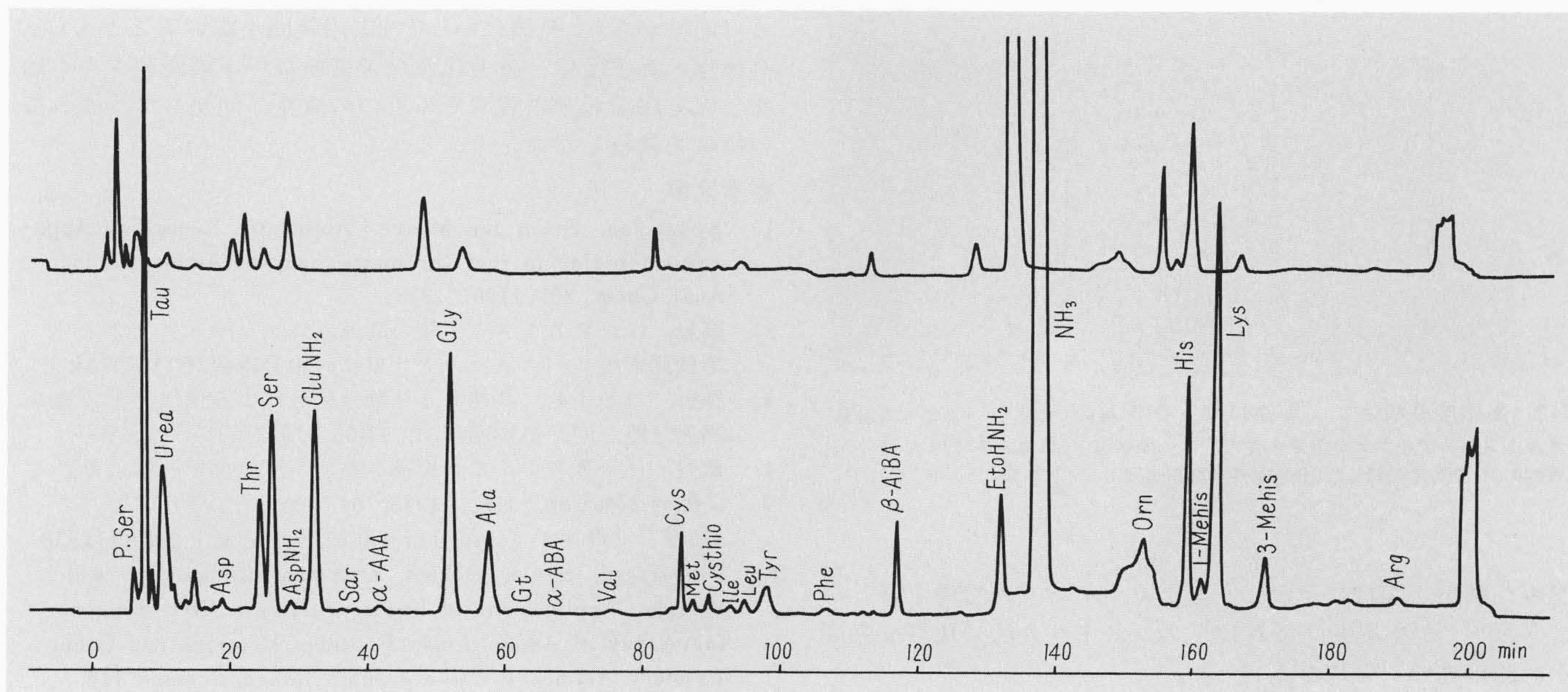



図9　生体液分析法による尿の分析例　健康な成人男子の凍結保存尿を，そのまま50μlについて分析した(分析条件は表1参照)。

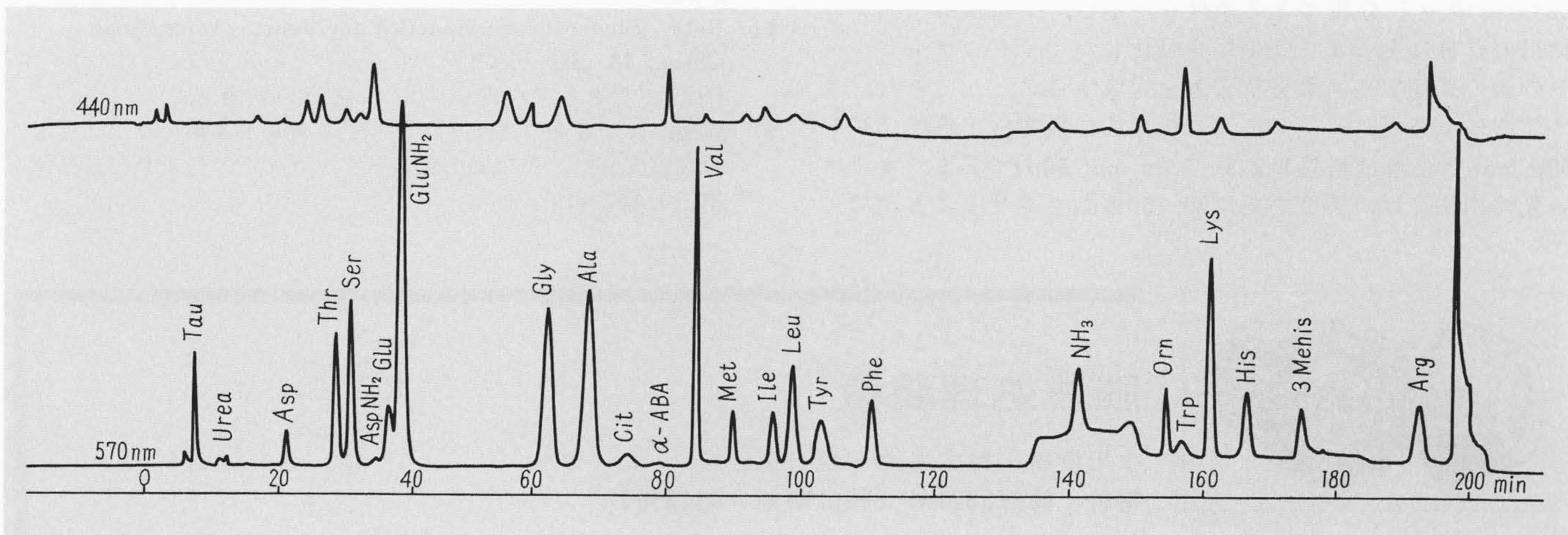



図10　生体液分析法による血清の分析例　血清を2倍に希釈したもの50μlについて分析した(分析条件は表1参照)。

することができる。

5.2　高分離分析法による分析例

先にも述べたとおり，アミノ酸の分析は多種にわたっている。例えば，大量に含まれるあるアミノ酸に対してごく微量含まれている特定のアミノ酸量を定量する必要がある場合には，それぞれのピークが完全に分離していることが必要である。そのため，カラム内径を4mmとして内容量を約2.4倍とすることによって，**図11**に示すように分離を向上させることができた。

5.3　高感度分析法

先に述べた小児の血液中のアミノ酸分析などでは，分析時間だけでなく，分析感度も更に向上させることが必要である。ここに報告した835形では，従来装置と比較すると，総合的な性能向上の結果として感度が約20～30倍向上したことに相当する。しかし，アミノ酸のニンヒドリン反応による検出法では検出感度にも限度があり，更に感度を向上させるために，けい光法が検討されてきた[6)~8)]。日立製作所はRoth[8)]の方法を応用したオルトフタルアルデヒドを用いたけい光検出法を

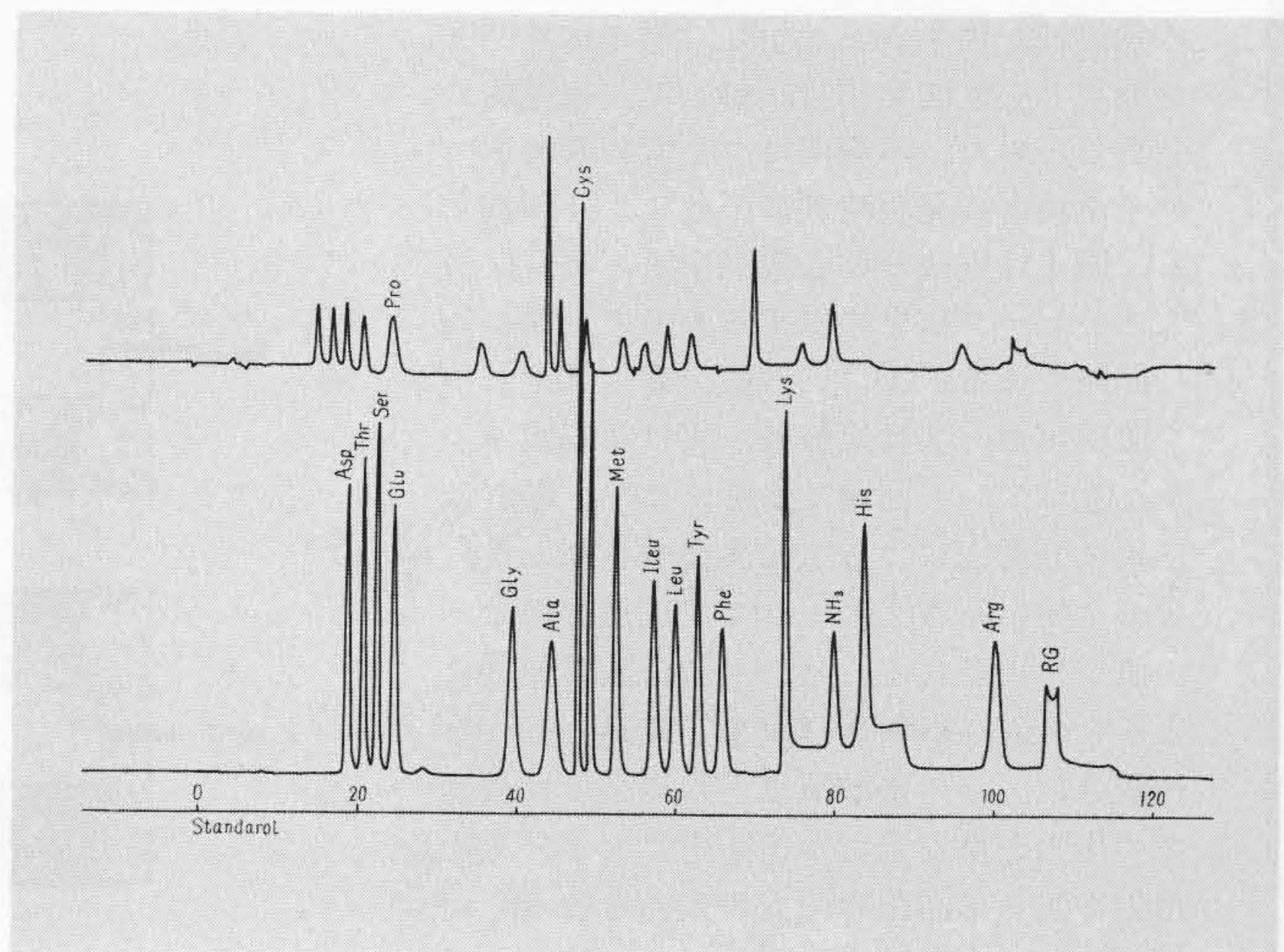



図11　標準分析法による高分離分析法のクロマトグラム　内径4mm，長さ150mmのカラムを用いて分離を更に向上させた(4×150mmカラム53℃，その他の分析条件は表1参照)。

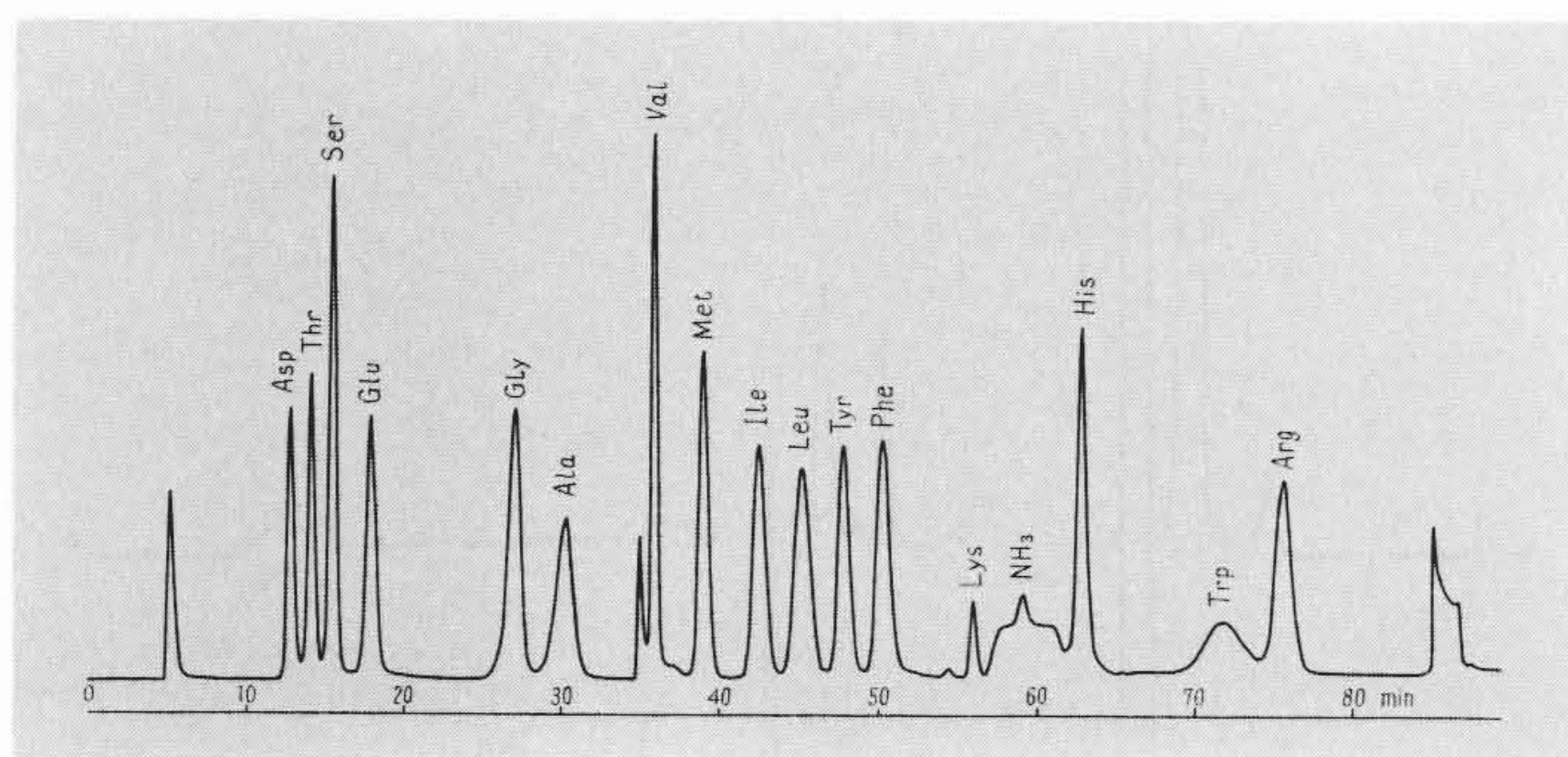



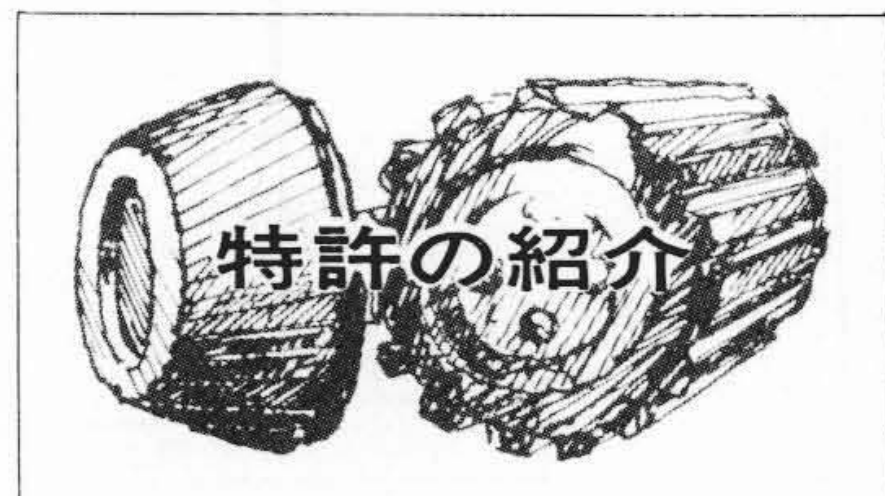
図12 高感度分析法によるクロマトグラムの一例 カラム溶出液にオルトフタルアルデヒド溶液を加え，けい光検出法(励起波長360nm，けい光波長440nm)で測定記録した(分析条件は図11と同じで，試料量125p mol/50μl)。

試みた結果，**図12**に示すようなクロマトグラムを得ることができた[9]。この方法によれば，ニンヒドリン法に比べて感度が約25倍高いことになる。

6 結 言

アミノ酸分析の高速化に関して実験検討した結果，再生・平衡化時間を含めても標準分析法を70分，生体液分析法では228分で繰返し分析できる条件を決定し，また試料添加から結果の計算に至るまで完全に自動化したマイクロコンピュータ内蔵の高速アミノ酸分析装置を完成することができた。この装置によると，ニンヒドリン検出法で最少検出感度は30～50p molで最適試料量は2.5～5.0n mol/50μlである。またけい光検出法では，感度を更に20～50倍向上させることができる可能性がある。今後はいっそう応用範囲を広げるとともに，高速化・高感度化・省力化及び装置取扱い上の便利さをも加味した方法論並びに装置そのものの改良に向かってたゆみない挑戦を続行したいと考える。

参考文献

1) Spackman, Stein and Moore : Automatic Recording Apparatus for Use in the Chromatography of Amino Acids. Anal. Chem., **30**, 1190 (1958)
2) 鴈野，ほか2名：アミノ酸の高速液体クロマトグラフィー，第12回応用スペクトロメトリ東京討論会講演2B11(1976年)
3) 鴈野，ほか4名：高速アミノ酸分析計による生体アミノ酸の高速分離，同上第13回講演，1B06 (1977年)
4) 武内，ほか3名：イオン交換クロマトグラフィーによるアミノ酸の高速分離，日化，1978，64
5) 835形日立高速アミノ酸分析計取扱説明書，日立製作所(1978)
6) Udenfriend, Stein, Böhlen, Dairman, Leimgruber and Weigle : Applications of Fluorescamine, a New Reagent for Assay of Amino Acids, Peptides, Proteins and Other Primary Amines in the Picomole Range, Science **178**, 871 (1972)
7) Maeda, Tsuji, Ganno and Ohnishi : Fluorophotometric Assay of Amino Acids by using Automated Ligand-Exchange Chromatography and Pyridoxal-Zinc(II) Reagent, J. Chromatogr., **77**, 434 (1973)
8) Roth : Fluorescence Reaction for Amino Acids, Anal. Chem., **43**, 880 (1971)
(オルトフタルアルデヒド法によるけい光検出法)
9) 伊藤，ほか3名：オルトフタルアルデヒドを用いたアミノ酸の高感度分析，第14回応用スペクトロメトリー東京討論会講演，IA07 (1978年)

脳波処理装置

小川俊雄・鈴木考治・塩野英己

特許 第878321号 (特公昭52—4113号)

脳波中に混入した心電は，異常脳波の一つであるスパイク波とその波形のこう配，曲率及び周期が類似しているため混同される危険性が生ずる。しかし，従来は専門医が脳波と心電図を同時記録して，視覚的に判別していた。本発明は，心電のR波をスパイク波との発現時刻の一致により判別する。**図1**は脳波及び心電図中から尖鋭度の大きいピーク値を検出するもので，共に同一回路である。①は二次微分器，②はピーク値検出器，③は比較器，④は単安定マルチ，⑤はアンド回路である。まず，脳波は二次微分器①によって二次微分された後，ピーク検出回路②によって二次微分のピーク値が検出される。ピーク値は比較器③によって一定の基準値(例えば1.3$\mu V/ms^2$)と比較され，その基準値以上の場合は比較器③の出力が単安定マルチ④をたたき，その出力がアンド回路の一方の入力となる。同様にして，心電図のR波のピーク値が，アンド回路⑤の他方の入力となり，この入力が，脳波中に混入して発生するR波を検出する制御信号となる。このようにして，心電図のR波をスパイク波と判断する欠点を除去でき，専門医によらなくても脳波を正確かつ容易に処理することができる。

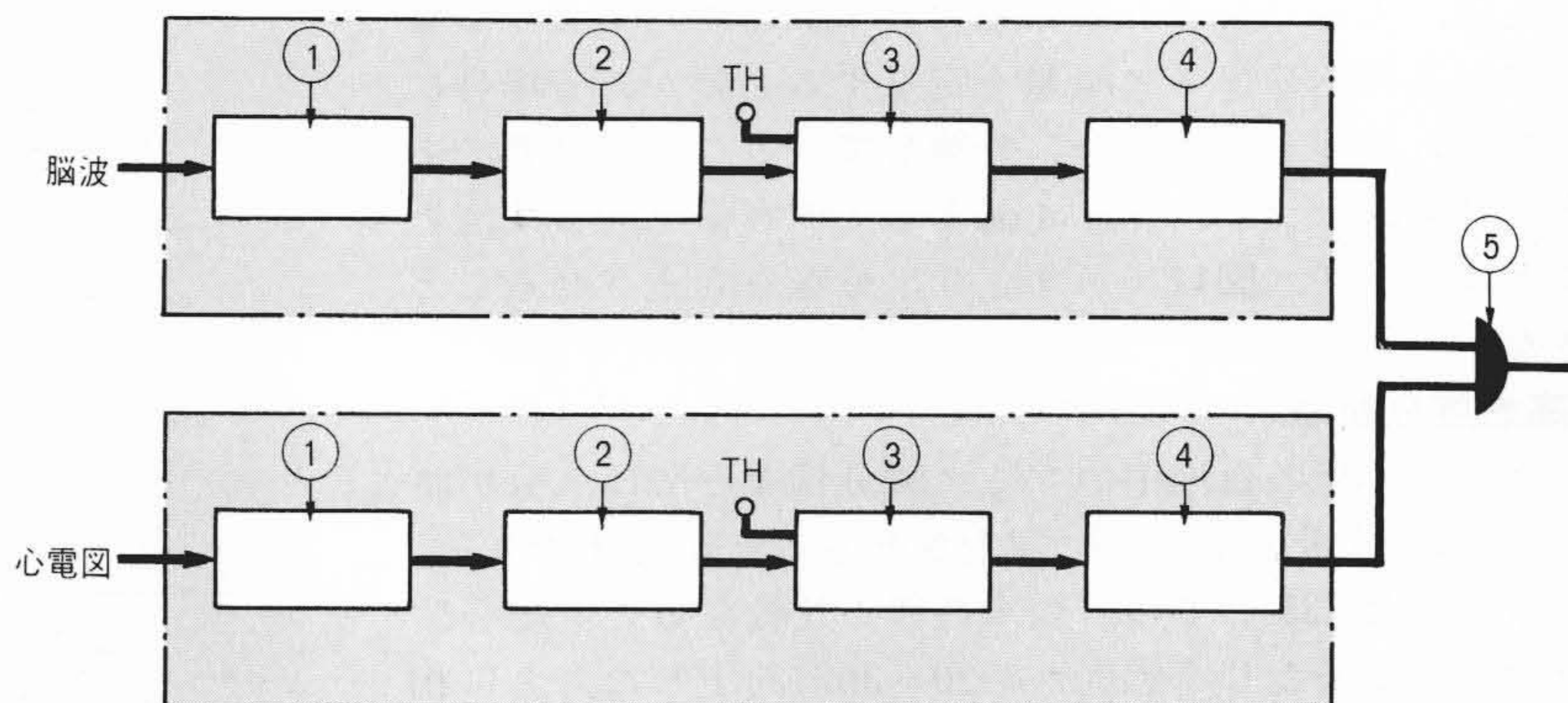



図1 R波とスパイク波の一致をとるブロック図